MANUEL TECHNIQUE

Maxwell® CSC RNA Blood Kit

Mode d'emploi du produit
AS1410
Ce produit est destiné à être vendu uniquement aux États-Unis et au Canada.

Attention : manier les cartouches avec précaution – les bords de la bande adhésive peuvent être tranchants.

IVD

Revised 1/15
TM434

Maxwell® CSC RNA Blood Kit

Toute la documentation technique est disponible à l'adresse : www.promega.com/protocols/
Veuillez consulter ce site Internet pour vérifier que vous utilisez la version la plus à jour de ce manuel technique.
Si vous avez des questions sur l'utilisation de ce système, veuillez contacter le service technique de Promega à l'adresse techserv@promega.com.

1. Description 1
2. Composants du produit et conditions de stockage 2
3. Indication du produit 5
4. Limites d'utilisation du produit 5
5. Avant de commencer : Préparation des solutions 6
6. Purification d'ARN à partir d'échantillons de sang total frais recueillis dans des tubes contenant de l'EDTA. 6
   - 6.A. Prétraitement des échantillons de sang total 7
   - 6.B. Préparation de la cartouche Maxwell® CSC 8
7. Exécution de l'appareil 10
8. Après la purification 12
9. Dépannage 12
10. Établissement d'un environnement sans ribonucléases 14
11. Références 14
12. Produits associés 15
13. Summary of Changes 15

1. Description

Le Kit Maxwell® CSC RNA Blood est utilisé en conjonction avec l'appareil Maxwell® CSC pour permettre la purification automatisée, efficace et aisée d'ARN à partir d'échantillons de sang total humain frais (non congelé) recueillis dans des tubes contenant de l'EDTA. L'appareil Maxwell® CSC est fourni avec des méthodes préprogrammées de purification. Il est conçu pour être utilisé avec des cartouches de réactifs pré-dispensés et des réactifs supplémentaires fournis dans le kit, pour une simplicité et une facilité d'emploi maximales. Cet appareil peut traiter jusqu'à 16 échantillons en 60 minutes environ. L'ARN purifié peut être utilisé directement dans diverses applications ultérieures, telles que la RT-PCR.

1. Description (suite)

Le Kit Maxwell® CSC RNA Blood purifie l'ARN à l'aide de particules paramagnétiques, offrant une phase solide mobile permettant d'optimiser la capture des échantillons, le lavage et la purification de l'ARN. Le Maxwell® CSC est un appareil de manipulation des particules magnétiques. Ce système permet à l'ARN de se lier efficacement aux particules paramagnétiques dans le premier puits d'une cartouche préremplie et fait progresser l'échantillon d'un puits à l'autre de la cartouche. Cette approche de capture magnétique évite certains problèmes courants propres à d'autres systèmes de manipulation de liquides fréquemment utilisés, tels que l'obstruction des cônes de pipettes ou le transfert incomplet des réactifs, qui peuvent entraîner une purification suboptimale.

2. Composants du produit et conditions de stockage

PRODUIT	CONDITIONNEMENT	RÉF.
Kit Maxwell® CSC RNA Blood	**48 préparations**	**AS1410**

Pour le diagnostic in vitro. Destiné à un usage professionnel uniquement.
Chaque système contient assez de réactifs pour 48 purifications automatisées à partir d'échantillons de sang. Les cartouches Maxwell® CSC sont à usage unique. Comprend :

- 48 Cartouches Maxwell® CSC RNA Blood
- 4 × 100 ml Solution A
- 30 ml Solution B
- 20 ml Tampon de lyse
- 2 flacons DNase I (lyophilisée)
- 900 µl 1-Thioglycérol
- 100 µl Colorant bleu
- 2 ×1 ml Solution de Protéinase K (PK)
- 25 ml Eau sans nucléases
- 50 Plongeurs CSC/RSC
- 50 Tubes d'élution (0,5 ml)

Conditions de stockage : dès réception du kit, retirer le 1-thioglycérol et le stocker entre 2 et 10 °C. Stocker les autres composants du kit à température ambiante (entre 15 et 30 °C). Le 1-thioglycérol peut être conservé à température ambiante (entre 15 et 30 °C) ; dans ces conditions, il sera stable jusqu'à 9 mois. Stocker la DNase I déshydratée entre –30 et –10 °C. Ne pas décongeler/ recongeler plus de 10 fois.

2. Composants du produit et conditions de stockage (suite)

Informations relatives à la sécurité : les cartouches de réactifs contiennent de l'éthanol, une substance inflammable. Le 1-thioglycérol est toxique. Le thiocyanate de guanidine et le chlorhydrate de guanidine (composants de la Solution B et du tampon de lyse) sont nocifs et irritants. Le tampon de lyse peut également nuire au développement du fœtus. Utilisez des gants et suivez des procédures standard de sécurité lorsque vous travaillez avec ces substances.

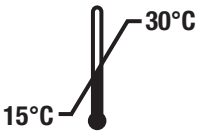
Les composants du kit Maxwell® CSC RNA Blood sont conçus pour être utilisés avec des substances potentiellement infectieuses. Les utilisateurs doivent être munis de protection individuelle appropriée (par ex., gants, blouse de laboratoire et lunettes étanches) pour la manipulation de ces substances infectieuses. Il convient de suivre les directives de l'établissement concernant la manipulation et l'élimination de toute substance infectieuse utilisée en conjonction avec ce système.

Remarque : l'eau de Javel réagit avec le chlorure d'ammonium et le thiocyanate de guanidine et produit des vapeurs toxiques. Le thiocyanate de guanidine est présent dans la Solution B et le chlorure d'ammonium dans la Solution A. N'utilisez pas d'eau de Javel pour la décontamination des déchets de ce kit.

Attention : manipulez avec soin les cartouches et le flacon contenant la DNase I lyophilisée, car les bords peuvent être tranchants.

Informations supplémentaires : les composants du kit Maxwell® CSC RNA Blood ont été validés et des contrôles de qualité ont été menés pour s'assurer qu'ils fonctionnent ensemble. Il n'est pas recommandé de mélanger des composants de plusieurs lots de kits. Utiliser uniquement les composants fournis dans le kit. Pour plus d'informations relatives à la sécurité, consultez la fiche technique santé-sécurité, disponible sur le site : **www.promega.com.**

2. Composants du produit et conditions de stockage (suite)

Symbole	Explication	Symbole	Explication
	Dispositif médical de diagnostic in vitro		Fabricant
	Stocker à 15-30 °C.		Nocif. Irritant.
	Important.		Avertissement. Risque de pincement.
	Réactifs inclus suffisants pour « n » tests		Numéro de lot
	Numéro de catalogue		Ne pas réutiliser.

3. Indication du produit

Le Kit Maxwell® CSC RNA Blood est conçu pour être utilisé en conjonction avec l'appareil Maxwell® CSC et la méthode de purification Maxwell® CSC RNA Blood comme dispositif médical de diagnostic in vitro (DIV) pour isoler l'ARN automatiquement à partir d'échantillons de 2,5 ml de sang total humain recueillis dans des tubes de prélèvement avec EDTA, contenant entre 4×10^6 et 10×10^6 leucocytes/ml. L'ARN purifié est adapté aux essais de diagnostic in vitro fondés sur l'amplification.

Le Kit Maxwell® CSC RNA Blood est conçu pour être utilisé avec 2,5 ml de sang total humain. Le Kit Maxwell® CSC DNA Blood doit être utilisé entre 15 et 30 °C. Toute utilisation en dehors de cette plage de température peut entraîner des résultats suboptimaux.

Le Kit Maxwell® CSC RNA Blood n'est pas destiné à être utilisé comme test spécifique de diagnostic.

Le Kit Maxwell® CSC RNA Blood est destiné à un usage professionnel uniquement. Les résultats de diagnostic obtenus à l'aide de l'ARN purifié avec ce système doivent être interprétés conjointement à d'autres données cliniques ou de laboratoire.

4. Limites d'utilisation du produit

Le Kit Maxwell® CSC RNA Blood est uniquement destiné à être utilisé avec des échantillons de sang total humain recueillis dans des tubes de prélèvement avec EDTA. Il n'est pas conçu pour les échantillons d'autres types, comme les échantillons de moelle osseuse ou de couche leucocytaire, les échantillons de sang prélevés dans d'autres types de tubes ou les échantillons de sang stockés en dehors des conditions recommandées.

Le Kit Maxwell® CSC RNA Blood n'est pas conçu pour être utilisé avec des échantillons non humains ou pour la purification de l'ADN.

Les performances du Kit Maxwell® CSC Blood RNA ont été évaluées pour isoler l'ARN à partir d'échantillons de 2,5 ml de sang total humain recueillis dans des tubes de prélèvement avec EDTA. Ce kit ne doit pas être utilisé avec des échantillons d'un volume supérieur ou inférieur à 2,5 ml. Il n'est pas conçu pour être utilisé avec des échantillons de sang total recueillis dans d'autres tubes que les tubes de prélèvement avec EDTA. Il n'est pas conçu pour être utilisé avec des échantillons de sang contenant moins de 4×10^6 ou plus de 10×10^6 leucocytes/ml.

L'utilisateur est tenu de valider la performance des acides nucléiques purifiés dans les applications de diagnostic ultérieures. Des contrôles appropriés doivent être inclus dans les applications de diagnostic ultérieures qui utilisent l'ARN purifié à l'aide du Kit Maxwell® CSC RNA Blood.

5. Avant de commencer : Préparation des solutions

1-Thioglycérol / Solution B

Préparez un mélange de 1-thioglycérol / Solution B selon l'une des méthodes suivantes :

Ajoutez 600 µl de 1-thioglycérol à la Solution B et mélangez avec soin. Le 1-thioglycérol est visqueux et il est important de le pipeter avec précaution pour prélever le volume adéquat. Avant utilisation, faites refroidir le mélange 1-thioglycérol / Solution B sur de la glace ou à une température comprise entre 2 et 10 °C.

Vous pouvez également préparer un volume plus réduit en ajoutant 20 µl de 1-thioglycérol par ml de Solution B. Préparez et refroidissez 200 µl de mélange 1-thioglycérol / Solution B par échantillon.

Remarque : stocker le mélange 1-thioglycérol / Solution B préparé entre 2 et 10 °C ; dans cette plage de température, il est stable jusqu'à 30 jours.

DNase I

Ajoutez 275 µl d'eau sans nucléases au flacon de DNase I lyophilisée. Inversez le flacon pour resuspendre la DNase I présente en dessous du capuchon, puis mélangez en tournant doucement (ne pas mélanger au vortex). Ajoutez 25 µl de Colorant bleu à la DNase I reconstituée – cela facilitera visuellement le pipetage et la préparation des cartouches. Chaque purification nécessite 10 µl de solution préparée de DNase I. Stocker la DNase I reconstituée entre –30 et –10 °C. Ne pas recongeler/ décongeler la DNase I reconstituée plus de dix fois.

Attention : Ouvrez le flacon contenant la DNase I avec précaution, car les bords peuvent être tranchants.

6. Purification d'ARN à partir d'échantillons de sang total frais recueillis dans des tubes contenant de l'EDTA.

Maintenez un environnement dépourvu de RNases au cours du traitement des échantillons. Utilisez uniquement des cônes de pipettes sans RNase et résistants aux aérosols. Changez fréquemment de gants pour diminuer les risques de contamination par RNases. Reportez-vous à la section 10, Établissement d'un environnement sans ribonucléases, pour plus de détails.

Matériel à fournir par l'utilisateur

- échantillons de sang total (non congelé) recueillis dans des tubes avec EDTA ; le sang peut être stocké entre 2 et 10 °C pendant un maximum de 3 jours avant la purification.
- microcentrifugeuse
- pipettes sérologiques de 10 ml (stériles)
- pipettes et cônes sans RNase, stériles et résistants aux aérosols
- tubes de 15 ml (stériles)
- centrifugeuse avec rotor à godets mobiles

6.A. Prétraitement des échantillons de sang total

1. Mélangez soigneusement le sang total non congelé dans le tube de prélèvement avec EDTA et transférez 2,5 ml à un tube stérile de 15 ml.
2. Ajoutez 7,5 ml de Solution A et mélangez en inversant le tube 5 à 10 fois. Au cours de cette étape de lyse différentielle, les globules rouges sont lysés et les leucocytes restent intacts.
3. Incubez les lysats à température ambiante pendant 10 minutes. Pendant cette incubation, inversez les échantillons deux fois pour les mélanger comme décrit à l'étape 2.
4. Centrifugez les tubes à 3 000 × *g* pendant 10 minutes dans un rotor à godets mobiles.
5. Retirez le surnageant en le versant ou en le pipetant hors du tube. Centrifugez brièvement les échantillons pour recueillir le liquide résiduel au fond des tubes. À l'aide d'une pipette, éliminez autant de surnageant que possible sans déloger le culot de leucocytes (qui devrait être visible).
6. Ajoutez 200 µl de 1-thioglycérol / Solution B refroidi et mélangez au vortex pour resuspendre le culot.
7. Ajoutez 200 µl de tampon de lyse et 25 µl de protéinase K au culot en suspension. Mélangez au vortex pendant 15 à 20 secondes.

   Remarque : si vous devez interrompre le prétraitement, les échantillons peuvent êtes stockés après l'étape 7 entre –30 et –10 °C pendant 5 jours maximum. À cette température, il est possible que les échantillons soient complètement congelés. Lorsque vous vous apprêtez à reprendre la purification des échantillons, décongelez les tubes à température ambiante pendant 10 minutes avant de passer à l'étape suivante.
8. Incubez à température ambiante pendant 10 minutes. Au cours de cette étape, préparez les cartouches comme indiqué à la Section 6.B.
9. Transférez le lysat au puits n° 1 (le plus grand puits) de la cartouche Maxwell® CSC RNA Blood.

6.B. Préparation de la cartouche Maxwell® CSC

1. Changez de gants avant de manipuler les cartouches Maxwell® CSC RNA Blood, les plongeurs CSC/RSC et les tubes d'élution. Les cartouches sont placées sur le portoir de la plateforme Maxwell® CSC en dehors de l'appareil, et le portoir contenant les cartouches et échantillons est alors transféré à l'appareil pour procéder à la purification. Placez les cartouches à utiliser sur le portoir de la plateforme Maxwell® CSC (Figure 2). Placez chaque cartouche sur le portoir de la plateforme, en vous assurant que le puits nº 1 (le plus grand puits de la cartouche) est le plus éloigné de tube d'élution. Appuyez verticalement sur la cartouche pour bien l'engager dans le portoir. Vérifiez que les deux extrémités de la cartouche sont engagées à fond dans le portoir de la plateforme. Retirez soigneusement la bande adhésive de protection de manière à la retirer intégralement du haut de la cartouche. Assurez-vous que toutes les bandes adhésives et tous les résidus de colle soient bien retirés de la cartouche.

   Attention : maniez les cartouches avec précaution – les bords de la bande adhésive peuvent être tranchants.

2. Placez un plongeur CSC/RSC dans le puits n° 8 de chaque cartouche.

   Remarque : utilisez uniquement les plongeurs fournis dans le Kit Maxwell® CSC RNA Blood. Les plongeurs des kits Maxwell® 16 LEV et SEV ne sont pas compatibles avec l'appareil Maxwell® CSC.

3. Pour chaque cartouche, placez un tube d'élution vide à l'emplacement prévu à cet effet dans le portoir de la plateforme Maxwell® CSC.

   Remarque : utilisez uniquement les tubes d'élution fournis dans le Kit Maxwell® CSC RNA Blood. Les autres tubes d'élution peuvent ne pas être compatibles avec l'appareil Maxwell® CSC et peuvent influencer le processus de purification de l'ARN.

4. Ajoutez 50 µl d'eau sans nucléases au fond de chaque tube d'élution. Les tubes d'élution doivent rester ouverts lors de la purification de l'ARN.

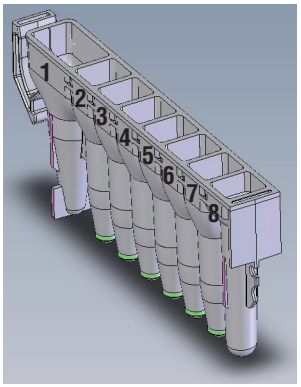
   Remarque : utilisez uniquement l'eau sans nucléases fournie dans le Kit Maxwell® CSC RNA Blood. L'utilisation d'un autre tampon d'élution peut influencer la purification de l'ARN ou son utilisation ultérieure.

5. Ajoutez 10 µl de DNase I reconstituée au puits (jaune) nº 4 de chaque cartouche. La couleur verte sert d'indicateur visuel confirmant l'ajout de la solution de DNase I au puits nº 4.

6.B. Préparation de la cartouche Maxwell® CSC (suite)

Remarques concernant la préparation des cartouches Maxwell® CSC RNA Blood

1. Si vous traitez moins de 16 échantillons, centrez les cartouches sur le portoir de la plateforme.
2. Les éclaboussures d'échantillons ou de réactifs présentes sur toute surface du portoir de la plateforme Maxwell® CSC doivent être nettoyées comme indiqué dans le *Manuel d'utilisation de l'appareil Maxwell® CSC*, nº TM373. N'utilisez d'eau de Javel sur aucune partie de l'appareil.



Contenu des puits
1. Solution de liaison
2. Particules magnétiques
3. Solution de lavage
4. Tampon de DNase I
5. Solution de liaison
6. Solution de lavage
7. Solution de lavage
8. Vide

Ajouté aux puits par l'utilisateur :
1. Lysat d'échantillon prétraité
4. 10 µl de DNase I préparée
8. Plongeur CSC/RSC

Figure 1. Cartouche Maxwell® CSC. Cette figure illustre le contenu d'une cartouche. L'échantillon de lysat de sang total est ajouté au puits nº 1, la DNase I (10 µl) est ajoutée au puits nº 4 et un plongeur est ajouté au puits nº 8.

Figure 2. Installation et configuration du portoir de la plateforme Maxwell® CSC. L'eau sans nucléases (50 µl) est ajoutée aux tubes d'élution comme indiqué.

7. Exécution de l'appareil

La méthode Maxwell® CSC RNA Blood peut être téléchargée à partir du site Internet de Promega : **www.promega.com/resources/tools/maxwellcscmethod**. Veuillez consulter le *Manuel technique d'installation des méthodes Maxwell® CSC*, nº TM401, pour de plus amples informations.

Si vous pensez que votre appareil pourrait être contaminé par des RNases, nettoyez-le avant la procédure à l'aide d'une solution de détergent telle que Steris LpH®. Suivez les instructions de la section Nettoyage et entretien du *Manuel d'utilisation de l'appareil Maxwell® CSC*, nº TM373.

1. Mettez sous tension l'appareil Maxwell® CSC et la tablette. L'interface utilisateur de l'appareil va démarrer automatiquement, réaliser une vérification et mettre en position toutes les pièces mobiles.
2. Sélectionnez « Start » (Démarrer) à partir de l'écran d'Accueil.
3. Scannez le code-barres de l'étiquette du Kit Maxwell® CSC RNA Blood ou saisissez-le manuellement afin de sélectionner automatiquement la méthode à exécuter (Figure 3).

   Remarque : le code-barres de la méthode du Kit Maxwell® CSC RNA Blood est requis pour pouvoir purifier l'ARN sur l'appareil Maxwell® CSC. L'étiquette du kit contient deux code-barres. Celui de la méthode est illustré dans la Figure 3 ci-dessous. Si le code-barres ne peut pas être scanné, contactez le service technique de Promega.
4. Sélectionnez la position des cartouches à traiter (consultez le *Manuel d'utilisation de l'appareil Maxwell® CSC*, no TM373) et scannez ou saisissez manuellement les données de suivi des échantillons. Le cas échéant, désélectionnez les positions non utilisées. Une fois que toutes les informations des échantillons ont été saisies, sélectionnez « Proceed » (Continuer).

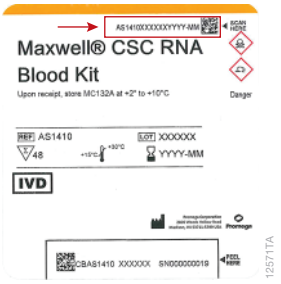


Figure 3. Étiquette du kit indiquant l'emplacement du code-barres à scanner pour charger la méthode. L'emplacement du code-barres de la méthode au haut de l'étiquette du kit est encadré en rouge et indiqué avec une flèche. Scannez ce code-barres pour démarrer une purification.

7. Exécution de l'appareil (suite)

5. Sur la tablette, vérifiez que les échantillons ont été ajoutés au puits nº 1 des cartouches (comme indiqué à la Section 6.B), que les cartouches sont chargées dans l'appareil, que les tubes d'élution contenant 50 µl d'eau sans nucléases sont présents et ouverts, et que les plongeurs ont été placés dans le puits nº 8.

6. Transférez le portoir de la plateforme Maxwell® CSC contenant les cartouches préparées dans l'appareil. Vérifiez que le portoir est placé dans l'appareil Maxwell® CSC de façon à ce que les tubes d'élution se trouvent du côté de la porte. Le portoir ne peut être inséré dans l'appareil que dans cette orientation. Si vous avez du mal à insérer le portoir sur la plateforme, vérifiez que celui-ci est dans la bonne orientation. Assurez-vous de placer le portoir horizontalement sur la plateforme.

   Remarque : tenez le portoir de la plateforme Maxwell® CSC sur les côtés pour éviter d'en déloger les cartouches.

Avertissement : risque de pincement.

7. Vérifiez que toutes les étapes de prétraitement requises ont été effectuées, puis appuyez sur « Start » (Démarrer) pour fermer la porte de l'appareil et commencer la purification.

8. L'appareil Maxwell® CSC commencera immédiatement le cycle de purification. L'écran affichera les étapes effectuées ainsi que le temps approximatif restant dans le cycle.

   Remarque : si le cycle est annulé avant la fin, l'appareil libèrera les particules des plongeurs et éjectera ces derniers dans le puits nº 8 de la cartouche. Les échantillons seront perdus. Il est inutile de tenter de repurifier des échantillons après l'annulation du traitement de l'appareil.

9. À l'issue du cycle, l'écran de la tablette affichera un message indiquant que la méthode est finie.

Fin du cycle

10. À la fin de la méthode, suivez les instructions à l'écran pour ouvrir la porte. Vérifiez que les plongeurs sont placés dans le puits nº 8 de la cartouche à la fin du cycle. Retirez le portoir de la plateforme de l'appareil et récupérez les échantillons élués du portoir. Si les plongeurs n'ont pas été éjectés de la barre de fixation des plongeurs :

    a. Après une annulation du cycle, suivez les instructions à l'écran pour effectuer la méthode de nettoyage (Clean Up).

    b. Après un cycle terminé normalement, sélectionnez cette même méthode (Clean Up) à partir de l'écran Settings (Paramètres).

11. Immédiatement après le cycle, pour éviter l'évaporation des éluats, refermez les tubes d'élution contenant l'ARN et retirez-les de l'appareil. Retirez le portoir de l'appareil Maxwell® CSC.

    Remarque : tenez le portoir sur les côtés en le retirant de l'appareil. Les échantillons d'ARN peuvent être stockés entre –30 et –10 °C pour une nuit ou à une température inférieure à –60 °C pour stockage à long terme.

Assurez-vous que les échantillons ont été retirés de l'appareil avant d'exécuter le protocole de décontamination par UV pour éviter d'endommager les acides nucléiques purifiés.

12. Retirez les cartouches et les plongeurs du portoir de la plateforme Maxwell® CSC et éliminez le tout en tant que déchets dangereux selon les procédures de votre établissement. Les cartouches, plongeurs et tubes d'élution sont à usage unique. Ne réutilisez pas les cartouches Maxwell® CSC, les plongeurs CSC/RSC ou les tubes d'élution.

8. Après la purification

Déterminez si le rendement des échantillons d'ARN et leur pureté répondent aux exigences des essais diagnostiques ultérieurs avant de les utiliser.

9. Dépannage

Pour toute question qui ne serait pas traitée ci-dessous, veuillez consulter une succursale ou un distributeur Promega local. Les coordonnées de ceux-ci sont disponibles au site : **www.promega.com**. Adresse électronique : **techserv@promega.com**

Symptômes	Causes possibles et commentaires
Concentration en ARN de l'éluat plus faible que prévu (un échantillon ordinaire devrait produire > 50 ng/µl d'ARN purifié).	Le taux de leucocytes de l'échantillon de sang se situait en dehors de la plage de 4×10^6 à 10×10^6 leucocytes/ml prévue pour ce produit. Ce kit a été optimisé pour la purification d'ARN à partir d'échantillons de sang contenant entre 4×10^6 et 10×10^6 leucocytes/ml.
	Un volume incorrect de sang total a été utilisé. L'utilisation d'un volume de sang total supérieur ou inférieur à 2,5 ml peut réduire le rendement.
	L'échantillon de sang était trop vieux. Les meilleurs rendements sont obtenus avec des échantillons de sang frais. Les échantillons stockés entre 2 et 10 °C pendant plus de 3 jours peuvent présenter un rendement réduit.
	L'échantillon a été stocké en dessous de 2 °C ou au-dessus de 10 °C avant la purification. Un stockage à une température incorrecte peut provoquer la lyse des leucocytes ou la dégradation de l'ARN.
	Des RNases peuvent avoir été introduites lors du traitement ou de la quantification des échantillons. Reportez-vous à la section 10 pour des informations concernant l'établissement d'un environnement sans ribonucléases.
	Une quantité insuffisante de surnageant a été retirée après la lyse différentielle. Assurez-vous que le surnageant est éliminé aussi complètement que possible.
	Le culot de leucocytes s'est détaché au cours de l'élimination du surnageant. Évitez de toucher le culot de leucocytes en retirant le surnageant.
	Le type d'échantillon était incorrect. Ce kit a été conçu pour être utilisé avec des échantillons de sang total humain. Les autres types d'échantillons (par ex. moelle osseuse, plasma, couche leucocytaire, etc.) n'ont pas été testés avec ce kit.
	Le type de tube de prélèvement de sang était incorrect. Ce kit a été conçu pour être utilisé avec des échantillons de sang total humain recueillis dans des tubes avec EDTA. Les autres types de tubes n'ont pas été testés avec ce kit et ne sont pas nécessairement compatibles avec la méthode du kit.

9. Dépannage (suite)

Symptômes	Causes possibles et commentaires
Faible qualité de l'ARN (le rapport A_{260}/A_{280} des éluats doit être supérieur à 1,8 et leur rapport A_{260}/A_{230} entre 1,8 et 2,4).	Le taux de leucocytes de l'échantillon de sang se situait au-dessus de la plage de 4×10^6 à 10×10^6 leucocytes/ml prévue pour ce produit. Ce kit a été optimisé pour la purification d'ARN à partir d'échantillons de sang contenant entre 4×10^6 et 10×10^6 leucocytes/ml.
	Un volume incorrect de sang total a été utilisé. L'utilisation d'un volume de sang total supérieur ou inférieur à 2,5 ml peut réduire le rendement.
	L'échantillon de sang était trop vieux. Les meilleurs rendements sont obtenus avec des échantillons de sang frais. Les échantillons stockés entre 2 et 10 °C pendant plus de 3 jours peuvent être de moins bonne qualité.
	L'échantillon a été stocké en dessous de 2 °C ou au-dessus de 10 °C avant la purification. Un stockage à une température incorrecte peut provoquer la lyse des leucocytes ou la dégradation de l'ARN.
	Une quantité insuffisante de surnageant a été retirée après la lyse différentielle. Assurez-vous que le surnageant est éliminé aussi complètement que possible.
	Le type d'échantillon était incorrect. Ce kit a été conçu pour être utilisé avec des échantillons de sang total humain. Les autres types d'échantillons (par ex. moelle osseuse, plasma, couche leucocytaire, etc.) n'ont pas été testés avec ce kit.
Niveaux élevés d'ADN dans les éluats (les éluats sont contaminés par de l'ADN, ce qui peut interférer avec les essais ultérieurs).	Le taux de leucocytes de l'échantillon de sang se situait au-dessus de la plage de 4×10^6 à 10×10^6 leucocytes/ml prévue pour ce produit.
	Un volume incorrect de sang total a été utilisé. L'utilisation d'un volume de sang total supérieur à 2,5 ml peut favoriser la contamination des éluats par de l'ADN.
	La DNase I n'a pas été ajoutée à la cartouche. Si possible, examiner le puits n° 4 des cartouches utilisées. Le puits n° 4 doit être de couleur verte (et non jaune) si la DNase I a été ajoutée aux cartouches à l'étape 5 de la Section 6.B.
Lysat prétraité trop visqueux pour le pipetage	Le taux de leucocytes de l'échantillon de sang se situait au-dessus de la plage de 4×10^6 à 10×10^6 leucocytes/ml prévue pour ce produit.
	Un volume incorrect de sang total a été utilisé. L'utilisation d'un volume de sang total supérieur à 2,5 ml peut se traduire par des lysats visqueux et difficiles à pipeter.

10. Établissement d'un environnement sans ribonucléases

Les ribonucléases sont extrêmement difficiles à inactiver. Prenez garde de ne pas introduire de RNases dans vos échantillons d'ARN pendant et après leur purification. Ceci est particulièrement important si le matériel de départ est difficile à obtenir ou s'il ne peut pas être remplacé. Les conseils ci-dessous peuvent aider à éviter la contamination accidentelle de vos échantillons par les RNases.

1. Deux des sources les plus courantes de contamination par RNases sont les mains de l'utilisateur et les bactéries ou moisissures pouvant être présentes dans les poussières de l'air. Pour éviter la contamination provenant de ces sources, utilisez une technique stérile lors de la manipulation des réactifs fournis dans ce système. Portez des gants à tout moment. Changez de gants chaque fois qu'un contact avec des RNases peut s'être produit.
2. Autant que possible, utilisez des récipients ou fournitures en plastique stériles et jetables pour la manipulation de l'ARN. Ces fournitures ne sont généralement pas contaminées par les RNases et aucun traitement d'inactivation de ces enzymes n'est nécessaire.
3. Traitez les récipients ou fournitures en verre ou en plastique non stériles et les cuves d'électrophorèse avant de les utiliser pour s'assurer qu'elles ne contiennent pas de RNases. Incubez les récipients ou fournitures en verre dans des fours à 200 °C pendant toute la nuit. Rincez les récipients ou fournitures en plastique avec une solution de NaOH à 0,1 N et d'EDTA à 1 mM, puis à l'eau sans RNases. Les produits destinés à l'élimination des RNases peuvent également être utilisés selon les instructions du fabricant.

   Remarque : les cuves d'électrophorèse peuvent être contaminées par des ribonucléases, la RNase A en particulier, suite à l'analyse d'échantillons d'ADN. Dans la mesure du possible, réservez exclusivement à l'analyse de l'ARN une nouvelle cuve d'électrophorèse ou une cuve décontaminée.
4. Traitez les solutions non fournies dans le système en ajoutant du diéthyl dicarbonate (DEPC) à 0,1 % (v/v) sous une hotte de laboratoire. Incubez à température ambiante sous agitation pendant toute la nuit sous la hotte. Stérilisez en autoclave pendant 30 minutes pour éliminer les traces de DEPC.

   Attention : le DEPC est un cancérogène présumé et ne doit être utilisé que sous une hotte de laboratoire. Le DEPC réagit rapidement avec les amines et, de ce fait, ne peut pas être utilisé pour les solutions tamponnées au Tris.

   Remarque : il est essentiel de continuer à protéger vos échantillons d'ARN contre les RNases dans toutes les procédures ultérieures. Portez des gants propres et utilisez des solutions et tubes à centrifugation sans RNases.

11. Références

1. Clinical Laboratory Standards Institute (2007) Handling, transport, and storage of specimens for molecular methods. Ce document peut être consulté en ligne au site : **www.clsi.org**
2. Murray, P.R. *et al.* (2007) *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Edition, ASM Press.

12. Produits associés

Appareil et accessoires

Produit	Conditionnement	Réf.
Appareil Maxwell® CSC*	1 pièce	AS4000
Portoir de la plateforme Maxwell® RSC/CSC	1 pièce	SP6019

* Pour le diagnostic in vitro. Ce produit est uniquement disponible dans certains pays.

Kits de réactifs Maxwell® CSC

Consultez le site **www.promega.com** pour une liste de tous les kits de purification Maxwell® CSC disponibles.

13. Summary of Changes

The following change was made to the 1/15 revision of this document:

1. Updated component name from Plongeurs CSC to Plongeurs CSC/RSC.

[a]Brevet américain n° 6 027 945, 6 368 800.

[b]Brevet américain n° 7 329 488 et autres brevets.

© 2014, 2015, Promega Corporation. Tous droits réservés.

Maxwell est une marque déposée de Promega Corporation.

LpH est une marque déposée de Steris Corporation.

Les produits peuvent être protégés par des brevets en instance ou déposés, ou peuvent présenter certaines restrictions. Veuillez visiter notre site Internet pour de plus amples informations.

Tous les prix et toutes les caractéristiques sont sujets à modification sans avis préalable.

Les déclarations relatives aux produits sont sujettes à modification. Veuillez contacter le service technique de Promega ou consulter le catalogue en ligne de Promega pour obtenir les informations les plus récentes sur les produits Promega.